

לקרן המדען הראשי

קוד זיהוי	א. נושא המחקר (בעברית)
820 - 0319 - 15	פיתוח קווי קרפיון מצוי ( <i>Cyprinus carpio</i> ) עמידים לוירוס ה-3 <i>Cyprinid Herpes Virus</i>

ג. כללי	
מוסד מחקר של החוקר הראשי	
פקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית בירושלים.	
סוג הדו"ח	תאריכים
מסכם	תקופת המחקר
	עבורה מוגש הדו"ח
	התחלה
	סיום
שנה חודש	שנה חודש
2 / 2013	12 / 2015
שנה חודש	שנה חודש
12 / 2015	

ב. צוות החוקרים		
שם פרטי	שם משפחה	
ליאור	דוד	חוקר ראשי
חוקרים משניים		
1	גדעון	חולתא
2		
3		
4		
5		
6		
7		

ד. מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח		
שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשנת תיקצוב הדו"ח בשקלים
קרן מדע"ר משרד החקלאות		150,000

ה. תקציר שים לב - על התקציר להיכתב בעברית לפי סעיף ה' שבהנחיות לכתובת דיווחים

הקרפיון המצוי מהווה נדבך חשוב בייצור חלבון מן החי בחקלאות המים בישראל ובעולם. ייצור קרפיון הנרי, Koi, השייך לאותו המין הביולוגי, הינו ענף יצוא חקלאי חשוב בישראל. מזה כעשור, הייצור של דגים אלו סובל ממחלה ויראלית קטלנית הפוגעת אנושות ביבולים בישראל ובשאר העולם. מחקר זה בא לטפל בבעיה באמצעות קידום פיתוח של קווי קרפיון עמידים למחלה. במחקר זה ייצרנו מעל 40 משפחות שונות, בדגש על מכלואי BC1 ובהתאם למטרות הניסויים, גידלנו אותן ובחנו את מידת העמידות של כל משפחה להדבקה בוורוס. מצאנו כי לתכונת העמידות מרכיב גנטי משמעותי שעובר בתורשה; משפחות צאצאים להורים עמידים יותר מראות עמידות טובה יותר. סיכום העבודה במכלואי BC1 מעיד על הפוטנציאל הרב ומניח את הבסיס להמשך טיפוח קווי קרפיון המעניקים לצאצאיהם עמידות טובה למחלה. ערכנו ניסוי נרחב שבו נדגמו רקמות מדגים עמידים ורגישים במהלך ההדבקה במחלה. הופק רנ"א מרקמות ומועדים שונים של חשיפה לוורוס ונבחן דפוס ביטוי של מספר גנים השייכים למערכת החיסונית המולדת. על סמך דפוסי הביטוי של גנים אלו יבחנו דוגמאות לאפיון כלל הטרנסקריפטום של דגים עמידים ורגישים במהלך המחלה. ניתוח ההבדלים בביטוי רנ"א בין דגים רגישים לעמידים יסייע בפענוח המנגנונים והגנים החשובים לעמידות. אפיינו את דינאמיקת ההדבקה בוורוס בדגים עמידים ורגישים. מצאנו כי בדגים רגישים, הווירוס מתפשט מהר יותר ומגיע לרמות הדבקה גבוהות יותר אשר גוררות אחריהן סיכוי גבוה יותר למוות. הבדלים אלו נוצרים בגין היכולת החיסונית המולדת, ואולי אף הנרכשת, הטובה יותר בדגים העמידים. לכן יש לחפש גנים המשפיעים על יכולת משופרת זו. לדוגמא, מצאנו ששונות בגן *IL10a* אכן נמצאת במתאם עם עמידות טובה יותר במספר משפחות. ביצענו אפיון של הבדלים גנטיים בין דגים רגישים לעמידים בעזרת עשרות אלפי סמני דנ"א. אותרו שלושה אזורים בגנום המכילים גנים המשפיעים על עמידות למחלה. שניים מאזורים אלו משותפים לשתי משפחות שונות. הסמנים באזור זה יבחנו כדי לקבוע את התאמתם לאיתור הורים עמידים. לסיכום, במחקר זה קידמנו את ההבנה של העמידות הגנטית למחלה ויצרנו בסיס במשפחות, סמנים וידע להמשך טיפוח קווי הורים לייצור צאצאים בעלי עמידות משופרת.

1. אישורים

הנני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצ"ב מוגש לפיהן

*אילן צנן*  
ליאור דוד

זהבה אוני

מנהל המחלקה

מנהל המכון  
(פקולטה)

אמרכלות  
(רשות המחקר)

רשות  
המחקר

15/12/2015

תאריך

(שנה) (חודש) (יום)

*אילן צנן*

דו"ח מדעי סופי לתכנית מחקר מספר 820-0319-13

### פיתוח קווי קרפיון מצוי (*Cyprinus carpio*) עמידים לוירוס ה-3 - *Cyprinid Herpes Virus*

#### Development of common carp lines resistant to Cyprinid Herpes Virus – 3

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ע"י

ליאור דוד המחלקה למדעי בע"ח, הפקוטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית בירושלים

גדעון חולתא המחלקה לעופות ומדגה, מנהל המחקר החקלאי בבית דגן

Lior David, Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, The Hebrew University of Jerusalem, P.O. Box 12, 76100, Rehovot. E-mail: [lior.david@mail.huji.ac.il](mailto:lior.david@mail.huji.ac.il)

Gideon Hulata, Dept. of Poultry and Aquaculture, Agricultural Research Organization, The Volcani Center, PO Box 6, Bet Dagan 50250. E-mail: [gidihulata47@gmail.com](mailto:gidihulata47@gmail.com)

### תקציר

הקרפיון המצוי מהווה נדבך חשוב בייצור חלבון מן החי בחקלאות המים בישראל ובעולם. ייצור קרפיון הנוי, Koi, השייך לאותו המין הביולוגי, הינו ענף יצוא חקלאי חשוב בישראל. מזה כעשור, הייצור של דגים אלו סובל ממחלה ויראלית קטלנית הפוגעת אנושות ביבולים בישראל ובשאר העולם. מחקר זה בא לטפל בבעיה באמצעות קידום פיתוח של קווי קרפיון עמידים למחלה. במחקר זה ייצרנו מעל 40 משפחות שונות, בדגש על מכלואי BC1 ובהתאם למטרות הניסויים, גידלנו אותן ובחנו את מידת העמידות של כל משפחה להדבקה בוורוס. מצאנו כי לתכונת העמידות מרכיב גנטי משמעותי שעובר בתורשה; משפחות צאצאים להורים עמידים יותר מראות עמידות טובה יותר. סיכום העבודה במכלואי BC1 מעיד על הפוטנציאל הרב ומניח את הבסיס להמשך טיפוח קווי קרפיון המעניקים לצאצאיהם עמידות טובה למחלה. ערכנו ניסוי נרחב שבו נדגמו רקמות מדגים עמידים ורגישים במהלך ההדבקה במחלה. הופק רנ"א מרקמות ומועדים שונים של חשיפה לוורוס ונבחן דפוס ביטוי של מספר גנים השייכים למערכת החיסונית המולדת. על סמך דפוסי הביטוי של גנים אלו יבחרו דוגמאות לאפיון כלל הטרנסקריפטום של דגים עמידים ורגישים במהלך המחלה. ניתוח ההבדלים בביטוי רנ"א בין דגים רגישים לעמידים יסייע בפענוח המנגנונים והגנים החשובים לעמידות. אפיינו את דינאמיקת ההדבקה בוורוס בדגים עמידים ורגישים. מצאנו כי בדגים רגישים, הוורוס מתפשט מהר יותר ומגיע לרמות הדבקה גבוהות יותר אשר גוררות אחריהן סיכוי גבוה יותר למוות. הבדלים אלו נוצרים בגין היכולת החיסונית המולדת, ואולי אף הנרכשת, הטובה יותר בדגים העמידים. לכן יש לחפש גנים המשפיעים על יכולת משופרת זו. לדוגמא, מצאנו ששונות בגן *IL10a* אכן נמצאת במתאם עם עמידות טובה יותר במספר משפחות. ביצענו אפיון של הבדלים גנטיים בין דגים רגישים לעמידים בעזרת עשרות אלפי סמני דנ"א. אותרו שלושה אזורים בגנום המכילים גנים המשפיעים על עמידות למחלה. שניים מאזורים אלו משותפים לשתי משפחות שונות. הסמנים באזור זה יבחנו כדי לקבוע את התאמתם לאיתור הורים עמידים. לסיכום, במחקר זה קידמנו את ההבנה של העמידות הגנטית למחלה ויצרנו בסיס במשפחות, סמנים וידע להמשך טיפוח קווי הורים לייצור צאצאים בעלי עמידות משופרת.

.....

**הצעות למעריכים עבור הדו"ח:**

1. דר' אבנר כנעני – [avnerc@volcani.agri.gov.il](mailto:avnerc@volcani.agri.gov.il), מנהל המחקר החקלאי בבית דגן.
2. פרופ' אמריטוס משה קוטלר – [moshek@ekmd.huji.ac.il](mailto:moshek@ekmd.huji.ac.il), בית הספר לרפואה של האוניברסיטה העברית בהדסה.
3. דר' גילה כחילה-ברגל - [gila.kahila@mail.huji.ac.il](mailto:gila.kahila@mail.huji.ac.il), בית הספר הוטרינרי של האוניברסיטה העברית ברחובות.
4. דר' שלי דרוין - [druvan@agri.huji.ac.il](mailto:druvan@agri.huji.ac.il), מנהל המחקר החקלאי בבית דגן.

**הצהרת החוקר הראשי:**

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.  
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר: ליאור דוד                      תאריך: 15/12/2015



**רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:**

תוצאות מחקר זה טרם פורסמו בעיתונות כתובה אך הוצגו ויוצגו בכנסים בינלאומיים.

## פיתוח קווי קרפיון מצוי (*Cyprinus carpio*) עמידים לוירוס ה-3 *Cyprinid Herpes Virus*

שמות השותפים למחקר: דר' ליאור דוד<sup>1</sup> ופרופ' גדעון חולתא<sup>2</sup>

<sup>1</sup>המחלקה למדעי בעלי-חיים, הפקולטה לחקלאות ברחובות, האוניברסיטה העברית בירושלים, [lior.david@mail.huji.ac.il](mailto:lior.david@mail.huji.ac.il).<sup>2</sup>המכון לחקר בעלי-חיים, מנהל המחקר החקלאי, בית-דגן.

### דיווח מדעי מסכם

#### 1. מבוא

תעשיית גידול הקרפיון המצוי למאכל מהווה נדבך מרכזי בחקלאות המים העולמית (7%) כשעיקר הייצור מרוכז באסיה (דרום-מזרח, מזרח ומרכז) ובמזרח ומרכז אירופה. בנוסף, קרפיון הנוי (קוי – Koi), הנמנה על אותו המין הביולוגי, נפוץ כחיית מחמד בקרב מגדלים בכל המדינות המתקדמות. בישראל, ייצור הקרפיון שני לייצור האמנון וייצור הקוי מהווה מרכיב מרכזי בענף יצוא דגי הנוי. החל משנת 1998, נפוצה בישראל ובשאר העולם מגיפה וירלית הנגרמת ע"י *Cyprinid Herpes Virus – 3* (CyHV-3), הגורמת הפסדים גדולים למגדלים. הווירוס ספציפי למין קרפיון מצוי, גורם שטפי דם והרס רקמות ותמותות של 60-100% מהיבול בתוך שלושה שבועות מהדבקה. הווירוס פעיל בטווח טמפרטורות של 18°C - 24 ולכן גלי המחלה אופייניים לעונות המעבר, שבהן פעילות מערכת החיסון של הדג חלשה מידי כדי לגבור על הפתוגן. בעשור האחרון נעשו עבודות על ידי מספר קבוצות בעולם על אפיון המחלה והווירוס, ואף פותח חיסון ישראלי המבוסס על נגיף מוחלש. השימוש בחיסון כיום מוגבל לישראל ובפועל היקף השימוש בתכשיר קטן בשל העלויות הכרוכות בו. לחילופין, פותח פרוטוקול חיסון ממשקי אשר חושף באופן מידתי את הדגים לוירוס האלים ללא גרימת מוות, אך פרוטוקול זה מורכב לביצוע, מצריך השקעה רבה ויישומו מוגבל לתקופות קצרות בשנה בשל טווח הטמפרטורות. שני הפתרונות הזמינים כרגע, מעבר לעלויות הכרוכות בהם, מנציחים את תפוצת הווירוס והמחלה. ככלל, הטיפול במחלות זיהומיות במערכות של חקלאות מים הוא מורכב, יקר, בעל יעילות נמוכה יותר ופחות ידיותי לסביבה יחסית לאפשרויות הקיימות בחיות משק אחרות. לכן, באופן כללי, ממשק גידול נכון משלב מניעת מחלות עם בידוד ומניעת הפצה של גורמי מחלה. באופן פרטני, ישנה חשיבות עליונה לכך בחקלאות המים. מהאפשרויות להבטחת ייצור בר-קיימא ויציב, פיתוח של קווי קרפיון עמידים גנטית למחלה הינו הפתרון העדיף. במסגרת מחקרים באירופה וגם בישראל נמצא כי אכן קיימים הבדלים גנטיים בין קווי קרפיון שונים ובין משפחות מקווים אלו בעמידות לוירוס. במחקרים נמצא כי לעמידות ערך תורשתיות גבוה, ממצא המצביע על שיפור גנטי אפשרי באמצעות סלקציה. מאידך, בעבודתנו נמצא כי בעוד הקווים המטופחים המשמשים לייצור הקרפיון בארץ רגישים מאד למחלה, במכלואים בין קווים מטופחים אלו לקו בר לא-מטופח, ניכרת עלייה דרמטית בעמידות. על אף הנחיתות של מכלואים אלו

בתכונות ייצור חשובות (מבנה-גוף ומידת כסות הקשקשים), מכלואים אלו מהווים נקודת מוצא מצינת לביסוס קוים מטופחים בעלי עמידות למחלה זו ויתכן אף לשורה שלמה של מחלות אחרות.

## 2. מטרת המחקר

במחקר זה אנו מציעים לקדם פיתוח קווי קרפיון בעלי עמידות גנטית לוירוס תוך הבנה של הבסיס החיסוני לעמידות ועל ידי שימוש במכלואים ובסיוע סמני דנ"א. מטרת המחקר כפי שנקבעו בהצעה הן:

- 2.1. בחינת העמידות של מכלואי BC1 ואיתור משפחות עמידות למחלה.
- 2.2. אפיון ההבדלים בתגובה הנוגדנית לוירוס בין משפחות עמידות לרגישות.
- 2.3. אפיון השינויים בביטוי גנים של המערכת החיסונית המולדת בתגובה להדבקה ווירוס.
- 2.4. פיתוח סמני דנ"א ואיתור סמנים הנמצאים בתאחיזה לעמידות למחלה.

## 3. תוצאות עיקריות

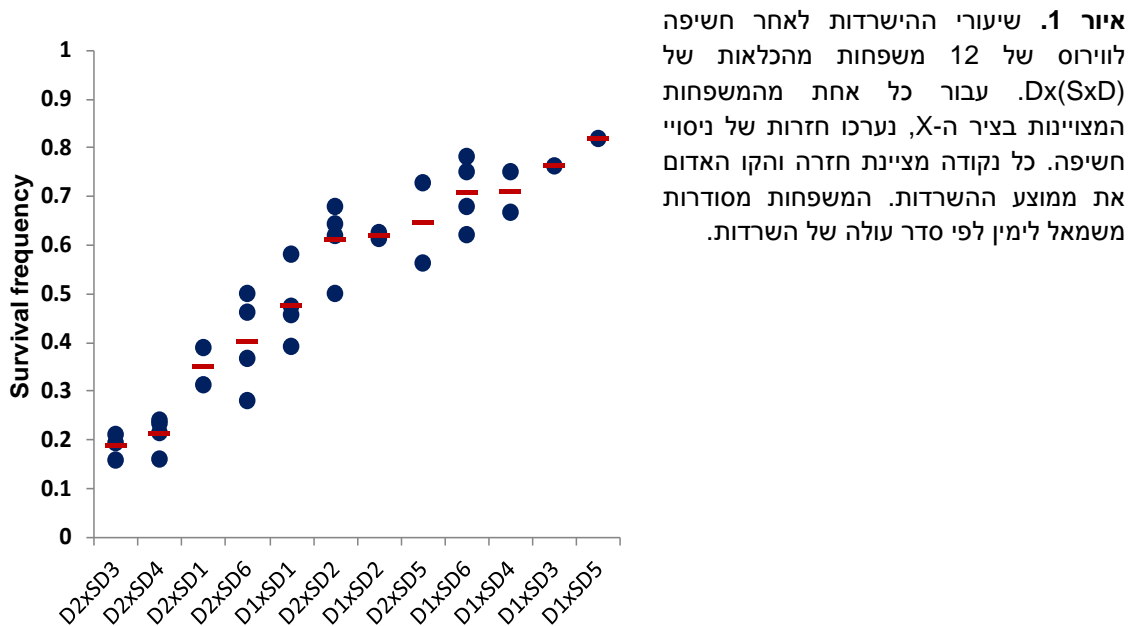
### 3.1. ניסויי חשיפה לוירוס של משפחות BC1

במהלך השנים האחרונות אנו מקדמים פיתוח של קווי קרפיון בעלי עמידות משופרת לוירוס ושמתיימים לגידול חקלאי מסחרי. בעבר הכלאנו בין קו הבר העמיד (סזאן - S), שאינו מתאים לגידול מסחרי, לבין קוים מסחריים הרגישים למחלה (דור 70 - D ויוגוסלבי - Y) לקבלת מספר משפחות F1, שלהן רמות שונות של עמידות למחלה. מטרת הניסויים בדור BC1 היא להתקדם דור נוסף לקראת ביסוס קווי קרפיון המתאימים לגידול מסחרי מחד, ומאידך, בעלי רמת עמידות טובה למחלה. לצורך כך נעשה שימוש בדגי F1 משני סוגי מכלואים: (S x D) ו-(S x Y). דגי F1 אלו הם שרדנים ממשפחות שנחשפו למחלה בשנים הקודמות ונקבע עבורן שיעור העמידות. הדגים נבחרו כך שהם מייצגים משפחות עם רמות עמידות שונות. דגי F1 אלו הוכלאו בהכלאות מחזירות לקוים המטופחים, ליצירת משפחות של (S x Y) x Y ומשפחות של (S x D) x D. כבקורות, ההורים מהקוים המטופחים הוכלאו ליצירת קבוצות Y x Y ו-D x D. הדגים ממשפחות ה-BC1 והבקורת השתתפו בניסויי חשיפה לוירוס כדי לקבוע את רמת העמידות של כל משפחה. כל משפחה נחשפה לוירוס במספר חזרות כדי לקבל אמדן ממוצע אמין יותר. בשל הרצון לייצג מגוון גנטי רחב כבסיס לטיפול קווי עמידים ובשל המגבלות על מספר הקבוצות, מספר הדגים בקבוצה ומספר החזרות לכל קבוצה, ייצור, גידול ובחינת קבוצות הדגים נערכו במהלך שלושת שנות המחקר. בסך הכול יוצרו במשך המחקר הזה 43 קבוצות דגים שונות (טבלה 1). מרביתן משפחות BC1 שיהוו בסיס להמשך פיתוח גנטי של קווי עמידים וחלקן האחר משפחות ששימשו למטרות המחקר האחרות (כפי שיוצג בהמשך).

טבלה 1. מספרי קבוצות שיוצרו לפי טיפוס גנטי.

טיפוס גנטי	BC1 - SDxD	BC1 - SYxY	YxY	DxD	SxS	SxY	SYxD
מספר קבוצות	12	14	7	2	3	3	2

במהלך המחקר בוצע היקף גדול של ניסויים בהם נבחנו הקבוצות הללו לרמת העמידות, כל קבוצה בשתיים עד שלוש חזרות, בשיטת הקוהביטציה (Cohabitation). בשיטה זו, דגים נאיביים מוכנסים למיכל החשיפה בו נמצאים דגים הנושאים את הנגיף ומדביקים את דגי הניסוי. למרות הקושי שבביצוע שיטה זו עבור מספר גדול של קבוצות, שיטה זו עדיפה, למשל על פני הזרקת הוירוס, כיון שהיא מדמה נכון יותר את אופן ההדבקה והתפשטות המחלה בתנאי שטח. דוגמא לשיעורי ההישרדות של קבוצות BC1 מוצגת באיור 1. באיור זה מסוכמים כ- 33 ניסויי חשיפה של מדגם משפחות מטיפוס D(SxD)xD. מדגם זה מעיד על היקף העבודה הרב שבוצע בתחום זה.

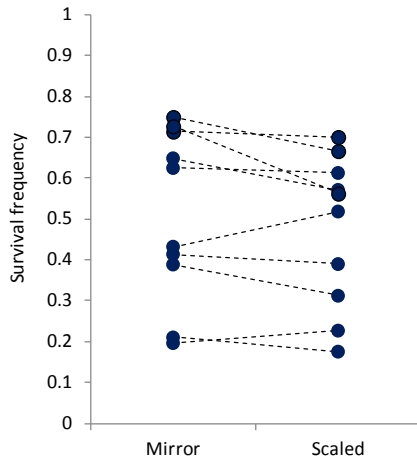


בניסויי החשיפה של משפחות ה- BC1 המוצגות נמצאו רמות הישרדות ממוצעות של בין 20% ל- 80% (איור 1). עולה כי לעומת ההתאמה הטובה של שיעורי השרידות בין החזרות של כל קבוצה, קיימת שונות רבה בין משפחות, מצב שמעיד על הרכיב הגנטי המשמעותי שיש לתכונת העמידות למחלה. אכן, משפחות ה- BC1 בעלות השרידות הגבוהה הן צאצאים של הורי F1 שבאו ממשפחות F1 בעלות שרידות גבוהה, ולהיפך לגבי משפחות ה- BC1 בעלות השרידות הנמוכה. נציגים של דגים ממשפחות ה- BC1 ששרדו את ניסויי החשיפה נשמרו וסומנו אינדיבידואלית כדי לשמש כהורים ליצירת הדור הבא.

### 3.2. בחינת השפעת כסות הקשקשים על העמידות למחלה

אחת מן התכונות החשובות המבדילות בין קו הבר לקויים המסחריים היא כסות הקשקשים של הדג. בעוד שלדג הבר כסות קשקשים מלאה, לדגים מהקויים המסחריים כסות קשקשים מינימאלית, מופע הנקרא דגם ראי (mirror carp). כסות הקשקשים המלאה של קו הבר היא אחת מהתכונות המפריעות לשימוש ישיר בו למטרת ייצור מסחרי, לפחות בארץ ובמדינות אירופה בהן מועדף טיפוס הראי. אופן

ההורשה של תכונה זו ידוע ומופע הראי הוא רצסיבי למופע הקשקוש המלא. לכן, לדגי המכלוא של דור F1 דגם קשקוש מלא. אולם, בהכלאה מחזירה מסוג BC1, בין דגי F1 לדגים מהקיום המסחריים בעלי דגם הראי, מתקבלת התפצלות של דגם הקשקוש ובכל משפחה כזו מחצית מהדגים בעלי קשקוש מלא ומחציתם בעלי דגם ראי. מצב זה מאפשר בחינה של השפעת דגם הקשקוש על השרידות בצורה הכי מבוקרת שיש, על ידי השוואה בין קבוצות אחים מאותה משפחה הנושאים דגם קשקוש שונה. בכעשרים השוואות תוך-משפחתיות כאלו שערכנו, מצאנו כי אין הבדל בשרידות בין דגים בעלי דגם קשקוש מלא לאחיהם בעלי דגם הקשקוש הרצוי, דגם הראי (איור 2).



**איור 2.** השוואת שיעורי ההשרדות לאחר חשיפה לוירוס בין דגים בעלי דגם קשקוש מלא לבין אחיהם בעלי דגם קשקוש ראי. באיור מדגם של עשר משפחות שמהן קבוצות אחים בעלי דגם קשקוש שונה מחוברות בקו מקווקו. ניכר כי למרות שקיימת שונות רבה בשעורי ההשרדות בין משפחות, ההבדלים בין דגים מאותה משפחה, שלהם דגם קשקוש שונה, אינם משמעותיים.

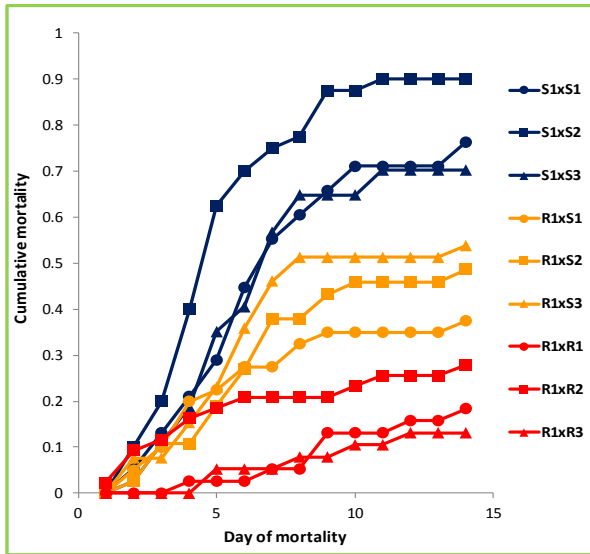
מהשוואות אלו בין אחים בעלי דגם קשקוש שונה עולות שתי מסקנות חשובות. האחת היא, שדגים בעלי דגם ראי לא רגישים יותר מדגים בעלי דגם קשקוש מלא. עד כה, כיון שדגים מקיום מסחריים היו גם בעלי דגם קשקוש ראי וגם רגישים, עלה החשש שפיתוח קיום מסחריים עמידים יתקל במכשול של דגם הקשקוש. תוצאות ניסוי זה מפריכות חשש זה. שנית, לעיתים דווח כי כסות הקשקשים המלאה מהווה קו הגנה ראשון בפני הדבקה במחלות. התוצאות שלנו מעידות כי לקשקוש הדג אין תפקיד משמעותי בהגנה על הדג מפני הנגיף הזה.

### 3.3. מדידת הבדלים ברמת ביטוי של גנים בין דגים עמידים לרגישים.

מטרת ניסויים אלו לאתר את המסלולים הביוכימיים והגנים המעורבים בהקניית עמידות למחלה. לצורך ניסויים אלו, ייצרנו תשע משפחות, שלוש משפחות מכל אחד משלושת הסוגים הבאים במבנה של חצאי אחים:  $S \times S$ ,  $S \times Y$ ,  $Y \times Y$  (טבלה 1). המשפחות בהן מעורבים הורים מקו S צפויות להיות עמידות ואילו שיוצרו מהורים מקו Y בלבד צפויות להיות רגישות. את מידת העמידות של כל אחת מתשע המשפחות מדדנו בניסוי מקדים של חשיפה למחלה (איור 3) לפני שערכנו את ניסוי דגימת הרקמות. ניתן לראות כי אכן הצלחנו לייצר שלוש חזרות של משפחות לכל אחת מרמות העמידות הרצויות: גבוהה, בינונית ונמוכה. תוצאה זו מעידה כי אנו יכולים לחזות את עמידות משפחות הצאצאים על סמך בחירת דגים בוגרים שבאו ממשפחות בעלות רמת עמידות ידועה כהורים. כלומר, אנו מסוגלים



לבחור דגים כך שצאצאיהם יהיו עמידים יותר או פחות. יכולת זו לחזות את האיכות הגנטית של דגי רבייה היא כלי חשוב בהמשך פיתוח קוים עמידים למחלה. בנוסף, ייצרנו את אותן תשע משפחות כך שייצגו שלוש רמות של עמידות שעליהן נאפיין את ההבדלים בביטוי הגנים. דגים מכל תשע הקבוצות נחשפו למחלה ונדגמו מהם רקמות בחמישה מועדים: 0, 2, 4, 8 ו-23 ימים מחשיפה. בכל יום דיגום נדגמו חמש רקמות משלושה דגים מכל אחת מהקבוצות. מתוך מספר הדוגמאות הרב שצברנו בניסוי זה נבחר את הדוגמאות האינפורמטיביות ביותר ואותן נשלח לריצוף רנ"א בשיטת ה-RNA-seq, שיטה שמאתרת את רמות הביטוי של כל הגנים המתבטאים בדוגמא. נתוני ביטוי הגנים יאפשרו לאתר גנים בעלי רמת ביטוי שונה בין דגים עמידים לרגישים בתגובה לחשיפה ויצביעו על המסלולים הביוכימיים החשובים ליצירת העמידות.

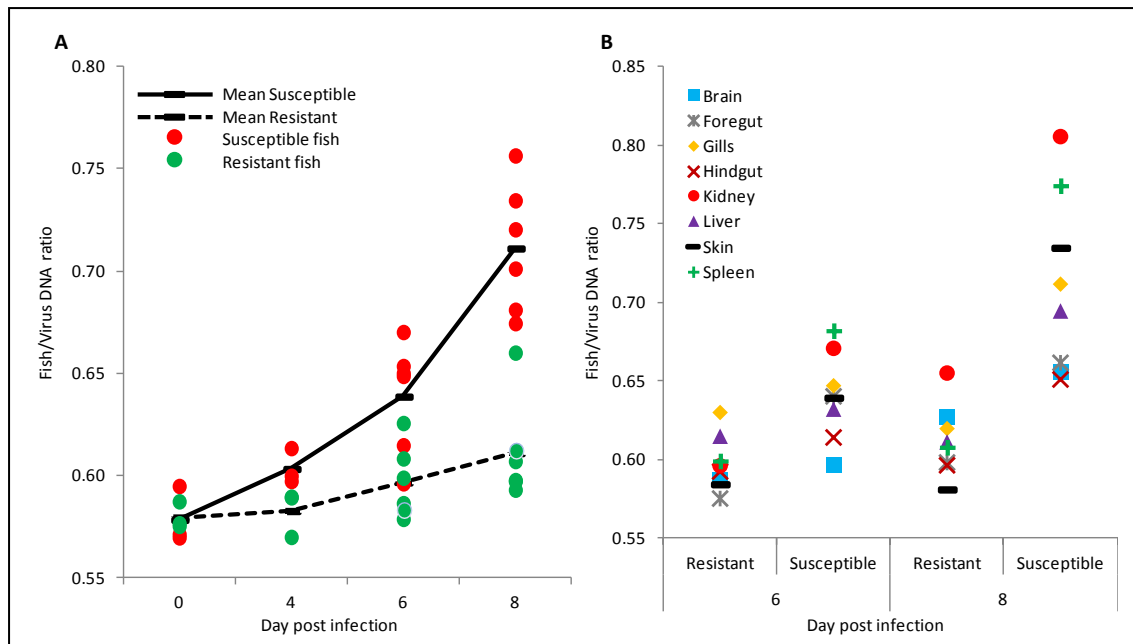


**איור 3.** עקומות תמותה מצטברת של תשע קבוצות הנבדלות ברמת העמידות למחלה. בכל עקומה מתואר שיעור התמותה המצטברת כפונקציה של הימים מחשיפה לזירוס. מוצגות עקומות עבור תשע קבוצות של חצאי אחים המתחלקות לשלוש רמות של עמידות למחלה: גבוהה (אדום), בינונית (כתום) ונמוכה (כחול). כל אחת מהקבוצות יוצרה מהכלאה בין הורים מטיפוס עמיד (R) או רגיש (S) כמצוין במקרא. דגים מקבוצות אלו נדגמו לצורך איפיון ההבדלים בביטוי גנים בין דגים עמידים לרגישים.

חשוב לציין כי יש מעט מידע בספרות על דינאמיקת ביטוי גנים במהלך הדבקה של קרפיונים ב-CyHV-3 וקשה להסיק מן הידוע על אילו גנים ומתי הם מתבטאים בתגובה להדבקה. יתרה מכך, אין בספרות מידע על ההבדלים בביטוי גנים במהלך ההדבקה בין דגים רגישים לעמידים. לכן, על מנת לברור בצורה מושכלת מי מהדוגמאות (רקמה ומועד) הן הדוגמאות האינפורמטיביות על מנת לבחון את ההבדלים ברמות ביטוי גנים בין דגים רגישים ועמידים, אנו מבצעים כעת סדרות ניסויים מקדימים לבחינת ביטוי גנים מייצגים במהלך ההדבקה. הנחנו כי במהלך ההדבקה יהיו שינויים בביטוי של גנים הקשורים למערכת החיסון המולדת של הדג. לכן תכננו פריימרים (תחלים) ל-qRT-PCR לבדיקת רמת הביטוי של שמונה גנים השייכים למערכת החיסון המולדת. בשלב זה אנו מכיילים את התנאים המיטביים לשימוש בכל אחד מהפריימרים האלו. במקביל הפקנו רנ"א מהטחול ומכליית הראש של דגים מודבקים ויצרנו ממנו cDNA. כרגע דפוס ביטוי הגנים הללו נבדק בימים השונים להדבקה כדי לקבל מידע ראשוני על דינאמיקת הביטוי במהלך ההדבקה, מידע שסייע בבחירת הרקמות ל-RNA-seq.

### 3.4. קביעת דינאמיקה של הדבקה בוורוס בדגים עמידים ורגישים

במחקר זה עד כה, תיארו את ההבדלים בין דגים עמידים לרגישים ברמת השרידות שלהם לאחר ההדבקה בוורוס. למעשה לא ידוע עדיין מה בדגים מביא להבדלים בשרידות. יתכן שדגים עמידים מוגנים בפני הידבקות בוורוס ויתכן כי דגים עמידים נדבקים אולם מצליחים למנוע את שכפול הווירוס ברקמות והתפשטותו בגופם. כדי ללמוד על דינאמיקת הווירוס במהלך המחלה עקבנו אחר רמות ההדבקה בימים השונים בדגים רגישים ועמידים. במהלך הניסוי דגמנו רקמות שונות בימים 0, 4, 6 ו-8 מחשיפה. בכל יום דגמנו רקמות משלושה דגים עמידים ושלושה דגים רגישים. מכל אחת מהדוגמאות הפקנו דנ"א ומדדנו ב- qRT-PCR את כמות הדנ"א היראלי יחסית לכמות הדנ"א של הדג בעזרת פריימרים ספציפיים לדג ולווירוס. בניתוח התוצאות, יחס גבוה יותר מעיד על כמות גבוהה יותר של וירוס ברקמה (איור 4).



**איור 4.** דינאמיקת ההדבקה בוורוס ברקמות שונות בדגים רגישים ועמידים. ערך גבוה יותר בציר ה-Y מייצג רמה גבוהה יותר של הדבקה. בפאנל השמאלי (A) התקדמות ההדבקה לפי ימים בדגים עמידים (עיגולים ירוקים) ובדגים רגישים (עיגולים אדומים). כל עיגול מייצג ממוצע על פני כל הרקמות של דג אחד. בקווים השחורים מוצג הממוצע הכללי של הרגישים (קו אחיד) ושל העמידים (קו מקווקו). בפאנל הימני (B) רמת ההדבקה ברקמות השונות בימים 6 ו-8 לאחר החשיפה בדגים רגישים ועמידים. כל נקודה מייצגת ממוצע של אותה רקמה משישה דגים.

מניסוי דינאמיקת ההדבקה למדנו מספר דברים חשובים. ראשית, ניתן להבחין בהדבקה כבר ביום 4 לאחר החשיפה ורמת ההדבקה עולה ביום 6 ואף יותר ביום 8. שנית, נמצאה הדבקה גבוהה יותר בדגים רגישים לעומת דגים עמידים. הבדל זה משמעותי יותר ככל שמתקדמים בזמן. שלישית, השונות ברמת ההדבקה גדולה יותר ככל שרמת ההדבקה עולה (התקדמות בזמן) וגדולה יותר בין דגים רגישים לעומת דגים עמידים. חשוב לייחס את רמות ההדבקה לעקומות התמותה מהמחלה. בניסוי אופייני, תמותת דגים מתחילה להופיע בסביבות הימים 8-10 מחשיפה וכך קרה גם בניסוי זה (ראה גם איור 5

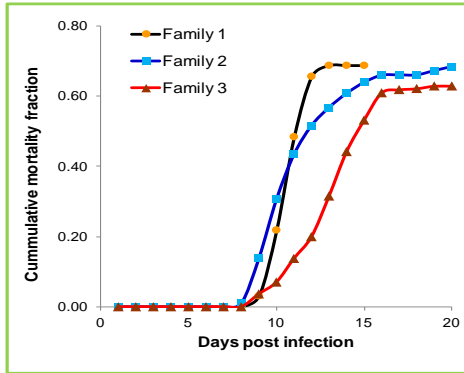
כדוגמא). בדגי ביקורת רגישים, שהשתתפו בניסוי לצד הדגים שנדגמו ללקיחת רקמות, החלה התמותה ביום 8 לחשיפה. כלומר, העלייה המשמעותית של משא הווירוס בדגים הרגישים מתאימה למועד התחלת התמותות וניתן להניח שהדגים שיצברו מהר יותר משא ווירוס גבוה יותר יהיו אלו אשר ימותו ראשונים. לכן, מדידת דינאמיקה של הפתוגן מחזקת את ההבנה שלנו לגבי ההבדלים בין דגים רגישים לעמידים. ראשית, גם דגים עמידים נדבקים בוורוס, ממצא ששולל את האפשרות שהעמידות נובעת מחוסר היכולת של הווירוס להדביק את הדג העמיד. שנית, כיון שמבנה הניסוי הוא בשיטת הקוהביטציה, דגים רגישים ועמידים חולקים יחד את אותה הסביבה. כלומר, משמעות משא הווירוס הנמוך יותר בדגים עמידים מעידה כנראה על היכולת הטובה יותר שלהם להתמודד עם התרבות והתפשטות הווירוס ברקמות, יכולת שמאפשרת להם לשרוד את המחלה. תובנה זו מתאימה לידיע שלנו מעבודות קודמות שלנו ושל אחרים המראות כי בדגים עמידים, כמו גם ברגישים, ניתן למצוא נוגדנים לוורוס בדם זמן רב לאחר סיום המחלה ולכן גם דגים עמידים שעברו את המחלה מתחסנים.

מבחינת הרקמות השונות, אין תוצאה חד משמעית המראה כי משא הווירוס כבד יותר ברקמה זו או אחרת. נראית מגמה שבאברי מערכת החיסון של הדג, כמו כליה וטחול, ניתן למצוא רמה ממוצעת גבוהה במקצת משאר הרקמות.

מלבד התובנות החשובות לגבי דינאמיקת ההדבקה וההבדלים בין דגים רגישים ועמידים, שמצאנו בחלק זה של המחקר, לתוצאות אלו השלכות חשובות לגבי הניסוי של מדידת הבדלים בביטוי גנים במהלך ההדבקה (ראה סעיף 3.3 לעיל). למעשה, בשל אילוצי העלות והיקף העבודה שנדרשים לביצוע אפיון ביטוי גנים בשיטת ה-RNA-seq, תוצאות אלו עוזרות בידינו להתמקד במועדים וברקמות בהן יש סיכוי לקבל את מיטב התוצאות לגבי הבדלים בביטוי גנים בין רגישים לעמידים. נראה כי למערכת החיסון המולדת תפקיד חשוב המאפשר לדגים עמידים להגיב ביעילות להדבקה בוורוס כבר ביום 4 לחשיפה. כמוכן, יתכן כי הבדלים במערכת החיסון הנרכשת מאפשרים ריסון יעיל יותר של התרבות הווירוס כבר בימים 6 ו-8. ניכר גם כי כדאי להתחיל באפיון ההבדלים בביטוי גנים בטחול ובכליה.

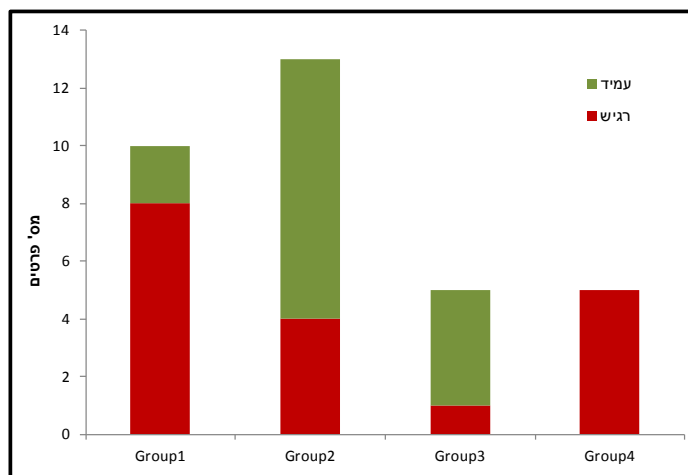
### 3.5. איתור סמני דנ"א ואזורים בגנום האחוזים לעמידות לוירוס

מטרת ניסויים אלו לאתר סמני דנ"א, שבהיותם אחוזים לתכונת העמידות, יצביעו על האזורים בגנום המכילים גנים חשובים לתכונה ויכלו כסמנים לסייע בטיפוח של קווי דגים עמידים למחלה. לצורך כך השלמנו שלושה ניסויי חשיפה של משפחות מיפוי שישמשו לאיתור סמנים לעמידות (איור 5). בכל משפחה סומנו הדגים באופן פרטני כך שעבור כל פרט נדגמו פיסת סנפיר ודוגמת דם להפקת דנ"א וגם נרשם יום התמותה אם מת ואם לא מת אז נרשם כשרדן.



**איור 5.** עקומות תמותה מצטברת של שלושת משפחות המיפוי. בכל עקומה מתואר שיעור התמותה המצטברת כפונקציה של הימים מחשיפה לוירוס.

לצורך איתור גנים וסמנים שנמצאים במתאם עם עמידות למחלה, נקטנו בשתי גישות. הראשונה, גישה של איתור גנים מועמדים ובחינת המתאם בין שונות גנטית בהם לבין שונות בתכונה. בעבודות קודמות, בודדנו מקרפיון מעל 20 גנים השייכים למסלולי העברת אותות שונים של מערכת החיסון המולדת, ריצפנו אותם ואיתרנו סמנים גנטיים בכל אחד מהם. השתמשנו בדנ"א מדגים עמידים (שרדנים) ורגישים (יום תמותה מוקדם) ממשפחת המיפוי הראשונה (איור 5) כדי לבחון את המתאם בין השונות בגנים השונים לבין העמידות למחלה. מכל רשימת הגנים שבחנו, מצאנו כי הגן *IL10a* נמצא במתאם בינוני אך מובהק לעמידות במשפחה הזו. הגן *Interleukin 10*, מקודד לציטוקין שגורר הפעלת תגובה אנטי-דלקתית בתגובה לזיהום. מצאנו שבקרפיון המצוי, שהוא מין טטראפלואידי, יותר ממחצית הגנים, כולל *IL10*, נמצאים בשני עותקים. משני העותקים, שדומים מאד אחד לשני ברצפי הדנ"א והחלבון שלהם, נמצא מתאם עם עמידות למחלה לעותק *IL10a* ולא לעותק *IL10b*. במסגרת המחקר הזה, המשכנו לחקור ובדקנו את המתאם של שני העותקים בארבע משפחות נוספות באמצעות סמנים חדשים שפיתחנו. בשתי משפחות המיפוי הנוספות (איור 5) ובאחת ממשפחות ה-BC1 (ראה סעיף 3.1), לא מצאנו מתאם מובהק. אולם, במשפחה שנייה של BC1 מצאנו מתאם מובהק בדומה למשפחת המיפוי הראשונה (איור 6). בכל ארבעת המשפחות הללו לא מצאנו מתאם בין הגן *IL10b* לבין עמידות למרות הדמיון הרב בין העותקים. אנו ממשיכים ובודקים את המתאם של שני העותקים במשפחות BC1 נוספות.



**איור 6.** מתאם בין גנוטיפים בגן *IL10a* לבין עמידות לוירוס. במשפחה זו נמצאו ארבעה גנוטיפים בגן (ציר X) ומוצגת התפלגות מספר הדגים הרגישים והעמידים בכל אחת מקבוצות הגנוטיפים שנמצאו. ניתן לראות שבקבוצות 1 ו-4 שיעור הפרטים הרגישים גבוה יותר ואילו בקבוצות 2 ו-3 שיעור הפרטים העמידים גבוה יותר.

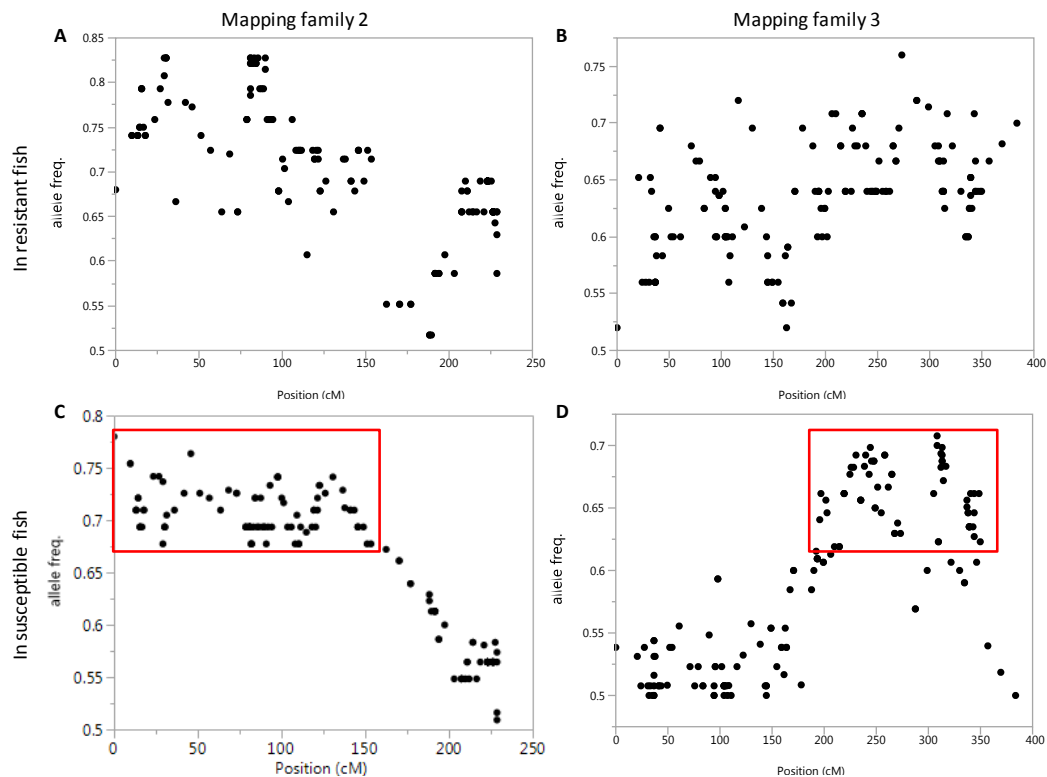
הגישה בה בוחנים את המתאם בין שונות בגנים מועמדים לבין שונות בתכונה היא גישה המתבססת על הידע הקיים בנוגע לתפקיד הגנים, מה שמאפשר להגדירם כמועמדים. לגישה זו הצלחה חלקית כמו שראינו לעיל. הגישה השנייה בה נקטנו כדי למצוא אזורים בגנום וסמנים בתאחיזה לתכונת העמידות אינה מוטית ביחס לידיע הקיים על תפקיד גן זה או אחר בתא. השיטה מתבססת על אפיון מספר רב של סמנים הפזורים בכל אזורי הגנום בכל אחד מהפרטים ובחינה של מתאם בין הגנוטיפים בכל אחד מהסמנים לבין תכונת היעד. ממשפחות המיפוי השנייה והשלישית, דגים שמתו בימי התמותה הראשונים (ימים 8-12, ראה אזור 4) נחשבו כרגישים ודגים ששרדו נחשבו כעמידים. הופק דנ"א מכמאה פרטים מכל משפחה ודוגמאות אלו נשלחו לאפיון גנוטיפי בשיטת ה- GBS (genotyping by sequencing) באוניברסיטת Cornell. למיטב ידיעתנו, זו הפעם הראשונה שנעשה שימוש בשיטה זו לפיתוח ואפיון מספר רב של סמנים בקרפיון המצוי, שכן שיטה זו פותחה לשימוש בצמחים. כיוול והתאמת שיטה זו לשימוש בקרפיון עברו בהצלחה וקיבלנו קרוב ל- 20,000 סמנים המתפצלים ביחסים המנדליים הצפויים בכל אחת מן המשפחות (טבלה 2).

**טבלה 2.** מספרי הסמנים הפולימורפיים שנתקבלו במשפחות המיפוי. הסמנים חולקו לאלו שנמצאו הטרוזיגוטים באם בלבד (אימהיים), באב בלבד (אבהיים) ובשני ההורים. לא כל סמן שפולימורפי במשפחה אחת גם פולימורפי בשנייה ולכן מוצגים גם מספרי הסמנים המשותפים הפולימורפים בשתי המשפחות.

מספר סמנים	אימהיים	אבהיים	שני ההורים	סה"כ
2 משפחה	12,822	2,722	1,510	17,054
3 משפחה	13,851	3,473	1,436	18,760
משותפים לשתי המשפחות	6,214	816	358	8,686

עבור כל אחד מהסמנים בכל אחת מהמשפחות בחנו את המתאם בין הגנוטיפ של הסמן למידת העמידות של הצאצאים הנושאים גנוטיפ זה. בסך הכול מצאנו 175, 106 ו- 27 סמנים במתאם עם עמידות למחלה במשפחה השנייה, השלישית ובמשותף לשתי המשפחות, בהתאמה. לאחר שקיבלנו מספר רב של סמנים העשויים לסייע בבחירת פרטים עמידים יותר יש להמשיך בניית התוצאות כדי לבחור מביניהם את הסמנים הטובים יותר מחד, ומאידך, כדי לנסות ולהבין מהם הגנים הנמצאים בקרבת סמנים אלו, שעשויים להיות הגנים ששונות בהם משפיעה על עמידות למחלה. ראשית, בקרב המספר הרב של הסמנים שקיבלנו בכלל, ובפרט בין אלו שנמצאו במתאם לתכונה, ישנם אלו אשר נמצאים בקרבה פיזית האחד לשני על הכרומוזום. סמנים אלו אשר נמצאים בתאחיזה גנטית אחד לשני אינם סמנים בלתי תלויים בהקשר של המתאם שלהם לתכונת היעד ואין סיבה להתייחס לכל אחד מהם בנפרד אלא רק לאלו שמייצגים הכי טוב כל קבוצת סמנים השייכת לאותו האזור הגנומי. לכן כדי לדעת בפועל כמה אזורים בגנום נמצאו, שגנים בתוכם משפיעים על תכונת העמידות, יש לסדר את כלל הסמנים למפה גנטית ולבחון היכן במפה נמצאים הסמנים שאחוזים לתכונת העמידות. יש לציין, שבניית מפות גנטיות מהתפצלות של סמנים במשפחה היא משימה שנעשית בשגרה מאז שנות השמונים של המאה שעברה כאשר פותחו שיטות הסמנים הראשונות. כיום, כבר אין צורך בבניית מפות גנטיות בכל אותם המינים שעבורם ידוע הרצף השלם של הגנום ושבהם כבר ידוע גם מיקום הסמנים על הרצף. במינים שלהם אין

ריצוף טוב של כל הגנום, כמו בקרפיון, יש עדיין צורך להרכיב מפות גנטיות וביצוע משימה זו עבור מספר כה רב של סמנים מהווה אתגר חישובי שבודדות התוכנות המסוגלות לעשותו בצורה אמינה. למשימה זו בחנו מספר תוכנות שפותחו למספר רב של סמנים ובחרנו באחת המאפשרת הרכבת מפה על סמך התפצלות במשפחות שנוצרו מהורים מסוג outbred בהן יש צורך להרכיב מפה מאוחדת בין סמנים הטרוזיגוטיים אימהיים, אבהיים ובשני ההורים. תוכנה זו גם יכולה לאחד בין מפות שנוצרו במשפחות שונות ולייצר מפה אחת מאוחדת. כל אחת מההרצות המרובות הנדרשות בתוכנה על מנת לקבל סידור אמין של הסמנים, דורשת כוח חישובי רב ומספר ימים ואנו עובדים על כך כעת. למרות זאת, וכדי להתקדם בנושא האזורים בגנום שמשפיעים על עמידות והסמנים שנמצאים במתאם להם, צמצמנו את מספר הסמנים הרב ובנינו מפה חלקית עבור הסמנים שנמצאו במתאם עם התכונה. בניתוח ראשוני זה, שיעשה בצורה אמינה יותר כשתהייה המפה הכוללת של הסמנים, מצאנו מספר אזורים בגנום שהסמנים בהם נמצאים במתאם עם תכונת העמידות. נמצאו שני אזורים במשפחת המיפוי השנייה ושלושה אזורים במשפחה השלישית (איור 7). שניים מן האזורים נמצאו מובהקים בשתי המשפחות.



**איור 7.** הדגמה של אזור אחד בגנום שהסמנים בו נמצאו במתאם עם התכונה במשפחת המיפוי השנייה (C+A) והשלישית (D+B). בציר ה-X מיקום יחסי על גבי קבוצת התאחיזה במפה הראשונית ביחידות סנטימורגן (cM). בציר ה-Y תדירות האלל הנפוץ יותר בדגים עמידים (B + A) או בדגים רגישים (D + C). התדירות הצפויה בסמן שאינו אחוז לתכונה הינה 0.5 ולכן סטייה מובהקת מתדירות זו מעידה על קשר בין הגנוטיפ בסמן לתכונת העמידות. בשתי המשפחות נראה כי באזור זה רצף הסמנים האחיד היוצר שיא ברור של סטייה מהתדירות הצפויה (מסגרות אדומות) נמצא דווקא בדגים הרגישים (D + C). למרות שאורך קבוצת התאחיזה שונה בין שתי המשפחות נראה כי אורך האזור המובהק דומה ומשתרע על כ- 150 cM בשתי המשפחות.

כמובן, שאותם שני אזורים החוזרים על עצמם בשתי המשפחות נותנים בטחון רב יותר בהשפעתם על תכונת העמידות. אולם, מתוצאות אלו עולה שוב כי במשפחות שונות קיימים גם אזורים שונים בעלי השפעה שונה על תכונת העמידות. תוצאה זו תומכת בממצאים שתיארנו לגבי *IL10a*, שגם הוא נמצא במתאם לעמידות רק בחלק מהמשפחות. יחד, תוצאות אלו מחזקות את המסקנה שקיבלנו על סמך השונות ברמות העמידות שמצאנו בין משפחות, המסקנה שבמקרה זה, העמידות היא תכונה כמותית והקביעה הגנטית של עמידות נעשית על ידי מספר גנים והשילוב ביניהם. מסקנה זו חשובה כיוון, שלא כמו בתכונות כמותיות (רב-גניות) אחרות בהן ניתן למדוד ערך רציף של התכונה לכל פרט (כדוגמת כמות החלב שנותנת פרה בשנה או משקל הפרי שמניב עץ), בשל אופי התכונה, לכל אחד מהפרטים אנו מודדים אחד משני ערכים - שורד או מת. לכן, עבור תכונות כמו קצב גידול למשל, אנו יכולים לבחור פרטים מצטיינים שימשו כהורים לדור הבא על סמך הביצוע העצמי שלהם בתכונה. עבור עמידות, לא כל מי ששרד ייצר דור צאצאים בעל שיעור גבוה של דגים עמידים. ניסיון העבר הראה, שלמרות שחומר הרבייה (בישראל וגם במדינות אחרות) מורכב כולו מדגים שרדנים, שיעור השרדנים מבין דגי הקרפיון שמייצרים מחומר הרבייה הנוכחי והשרדן נמוך. מסקנה חשובה זו נתמכת גם מתוצאות הסמנים עבור האזור המוצג באיור 7. בעוד שדגים רגישים מראים אחידות בשיעור האלל לרגישות במרבית המכרעת של הסמנים באותו אזור, בדגים רגישים, שיעור האלל לעמידות משתנה בין סמן לסמן. יתכן וזה נובע מכך שדג שרדן אינו דווקא עמיד ובין השרדנים ישנם דגים רגישים יותר יחד עם עמידים יותר, מה שגורר גם שונות גבוהה יותר בשכיחות האללים בדגים עמידים בין סמנים באותו אזור גנומי. משתמע מכך שלתכונה זו בסיס רב-גני והסמנים שמצאנו יסייעו לומר מי מהפרטים השרדנים עמיד יותר, כלומר מתאים יותר לשמש כהורה כדי לייצר קבוצות צאצאים בעלות עמידות גבוהה יותר. בנוסף, ממצאים אלו מדגישים את החשיבות של בחירת פרטים עמידים יותר על סמך עבודה במשפחות כפי שעשינו עד כה (ראה סעיף 3.1). שיטה זו מאפשרת בחירה של פרטים עמידים על סמך ממוצע המשפחה שלהם, ובמחקר עתידי נמשיך להשתמש בשיטה זו תוך שילוב מידע מסמני דנ"א.

#### 4. דיון בתוצאות המחקר והשלכותיו

במהלך השנים האחרונות אנו מקדמים פיתוח של קווי קרפיון בעלי עמידות משופרת לוויורוס ושמתיימים לגידול חקלאי מסחרי. בצד מהלכים טיפוחיים אלו, אשר נעשים בשיטות קלאסיות של השבחה גנטית במשפחות, אנו מפתחים כלים למחקר גנטי וגנומי מתקדם במין חשוב זה וחוקרים את הבסיס הגנטי של עמידות למחלה בשיטות שונות. קצב ההתקדמות בהשבחה גנטית כמו גם היכולת לחקור את הבסיס הגנטי של תכונות תלוי במשך הדור של האורגניזם, שכן המחקר מבוסס על יחסי הורים-צאצאים. בקרפיון המצוי, יש לגדל את הדגים כשנה וחצי כדי שיכנסו לבגרות מינית וישמשו כדור הבא במחקר. לכן, במסגרת תקופת המחקר הזו, ביססנו את העבודה על יצירת משפחות מטיפוסים שונים ובעיקר מדור BC1, תוך שימוש בחומר הגנטי לבריור שאלות על ההדבקה בוויורוס ועל התגובה של הדג בדגש על ההבדלים בין דגים עמידים לרגישים. מעבודת מחקר זו עולות מספר תובנות חשובות

שישפיעו, מחד על כיווני ההמשך למחקר ומאידך על הדרך להמשיך ולייצר גרעין רבייה לייצור דגים בעלי עמידות משופרת למחלה. להלן עיקרי התובנות שהושגו באמצעות מחקר זה:

4.1. עמידות גנטית בדגים מדור BC1 - דור BC1 מהווה נקודת פתיחה טובה לייצור של דגי רבייה מסחריים בעלי עמידות משופרת. דור המכלוא F1 עם קו הבר, על אף העמידות הטובה שלו למחלה, אינו מתאים לגידול מסחרי בשל מספר תכונות וביניהן מבנה הגוף וכסות הקשקשים המלאה. בדור BC1, בו הוכלאו דגי F1 חזרה לקווים המסחריים, קיבלנו צאצאים בעלי דגם ראי בקשקוש ובעלי צורת גוף דומה יותר לקווים המסחריים. יתרה מזאת, הראנו בפעם הראשונה עבור דג זה ומחלה זו, שניתן לקבל משפחות בעלות עמידות גבוהה גם בדור BC1. כלומר המרכיב הגנטי של תכונת העמידות שעובר בתורשה משמעותי וניתן בשיטות של סלקציה משפחתית לברור דגים בעלי עמידות משופרת גם בדורות מתקדמים יותר. כמוכן, הראנו כאן את השונות הרבה בין משפחות הקיימת בתכונת העמידות. כלומר, המשך טיפוח קווים עמידים יצטרך להתבסס על המשך בחינת משפחות BC1 רבות יותר כדי לברור מתוכן את הטובות ביותר. חשוב לשמור על בסיס גנטי רחב בשלב זה של הטיפוח ולא להמשיך עם מספר מצומצם של משפחות, מה שבטוח קצר עלול להביא לעלייה בשארות של הקווים העמידים. הבסיס להמשך עבודה זו הונח באמצעות תכנית המחקר הזו.

4.2. כסות הקשקשים ועמידות למחלה - בעבודות קודמות, כולל שלנו, שנערכו בארץ ובאירופה, נמצא שהקווים המסחריים הנפוצים רגישים ל- CyHV-3. מרבית הקווים המסחריים הללו הם בעלי כסות קשקשים מופחתת, דגם המכונה ראי. מאוסף עבודות אלו עלה הרושם כי לכסות הקשקשים המלאה יתרון בהקניית עמידות למחלה, מה שלכאורה יכול להפריע לטיפוח קווים מסחריים עמידים. אולם, כפי שהראנו בעבר וגם במהלך מחקר זה, קיימת שונות רבה ברמת העמידות בין משפחות. לכן עד כה, הבדלים בעמידות שתועדו בין דגים בעלי דגם קשקוש ראי לדגים בעלי דגם קשקוש מלא כללו בתוכם גם הבדלים בין משפחות, מה שלא איפשר להפריד בין ההשפעות של שני גורמים אלו. כיון שכאן נבחנה לראשונה העמידות של משפחות BC1 שונות, שבכל אחת מהן דגים אחים הנבדלים בדגם הקשקשים, הראנו בפעם הראשונה שלכסות הקשקשים משקל נמוך בקביעת העמידות הגנטית למחלה. ממצא זה חשוב כיון שהוא סולל את הדרך להמשך טיפוח דגי רבייה שייצרו דגים עמידים בעלי דגם ראי, כפי שמעדיף השוק בארץ ובאירופה.

4.3. הבדלים בדינאמיקת ההדבקה בוורוס בין דגים עמידים לרגישים - במחקר זה מצאנו כי התרבות הווירוס בדגים עמידים איטית יותר ומוגבלת ביחס לדגים רגישים. הסיכוי לשרוד את המחלה נקבע בסופו של דבר באינטראקציה שבין הפתוגן (ווירוס במקרה זה) לבין המאכסן (הדג במקרה זה). מכאן, שהעמידות הגנטית שאנו חוקרים כאן היא כנראה תוצאה של יעילות טובה יותר בהשתלטות על ההדבקה. דגים עמידים שורדים כיון שכבר משלב מוקדם הם מצליחים לשמור על רמת הדבקה נמוכה יותר. לכאורה, מסקנה ברורה מאליה. אולם, גם אפשרויות אחרות קיימות, כמו למשל, שהווירוס מתקשה לחדור לגוף הדג העמיד. תוצאות ניסוי זה הינן הפעם הראשונה שבה מתואר ההבדל בהתפשטות הווירוס בין דגים עמידים לרגישים. לתוצאות אלו חשיבות במספר היבטים. ראשית, יש לצפות שלמערכת החיסונית המולדת, זו שכבר מלכתחילה מצליחה לעורר תגובה שתשמור על רמת הדבקה נמוכה יותר,



תפקיד חשוב בהקניית העמידות. לכן בתכנון וניתוח הניסויים הבאים, כגון מדידת הבדלים בביטוי גנים בעזרת qRT-PCR, יש לשים דגש על גנים חשובים לעירור מערכת החיסון המולדת. ניסוי זה נערך בימים אלו במתכונת כזו. כמוכן, ניסוי זה איפשר לנו לעשות בחירה מושכלת של דוגמאות (מועדים ורקמות) מהן נפיק רנ"א ונשלח לביצוע אפיון של טרנסקריפטום באמצעות RNA-seq.

מעבר לכך, לממצאי ניסוי זה חשיבות בהקשר של פיתוח דגים עמידים. הממצא שאומר שדגים עמידים יעילים יותר בהשתלטות על ההדבקה מעידה על מנגנון חיסוני יעיל יותר, מנגנון שכנראה מבוסס על פעולה טובה יותר של מספר גנים. כנראה שהעמידות לא מתבססת על שונות בגן יחיד שמביא לחסר או מצאי של חלבון, כמו למשל קולטן, שבגינו הווירוס מדביק טוב יותר דגים רגישים. לכן, ניסוי ההדבקה נותן תמיכה להשערה זו של ריבוי גנים החשובים לעמידות (מסקנה שנתמכת גם בתוצאות נוספות שהוזכרו). בנוסף, אם אכן מדובר בהגנה טובה יותר שמעניקה מערכת החיסון של דגים עמידים, עולה הסיכוי שהגנה כזו תמצא גם מול פתוגנים אחרים. ניסוי ההדבקה תומך במנגנון עמידות כללי יותר ולא דווקא ספציפי לוורוס ה-CyHV-3.

**4.4. סמנים גנטיים לעמידות** - במסגרת מחקר זה, ייצרנו תשתית של עשרות אלפי סמנים למחקר בקרפיון המצוי. למרות החשיבות החקלאית של דג זה, התשתית הגנטית למחקר והשבחה עדיין בראשיתה. תשתית הסמנים שייצרנו חשובה ותסייע במחקר הגנטי בכיוונים שונים. ראשית, נסיים את הרכבת המפה הגנטית הכוללת. על המפה הגנטית הזו נמקם את כל אותם הסמנים שנמצאו במתאם לתכונת העמידות כפי שעשינו בגרסה הראשונית (איור 7). לאחר שנעשה זאת בגרסה הסופית נוכל לקבוע את מספר האזורים בגנום שנמצאים במתאם. מאזורים אלו ניקח סמנים שהמתאם שלהם גבוה (נמצאים באזור המתאם הגבוה ביותר) ונבדוק את המתאם עם עמידות בכ- 10 משפחות BC1 שעבורן יש לנו גם רישום יחידני של יום התמותה וגם דוגמאות דנ"א. סמנים שנוודא את המתאם שלהם במשפחות נוספות, נבחן הלאה בכמה עשרות דגים שאינם קרובי משפחה, דגים ששימשו כהורים בניסויים שלנו ועבורם ידועה לנו מידת העמידות של צאצאיהם. אם נמצא סמנים שמראים מתאם עם עמידות גם ללא מבנה משפחתי, נוכל להשתמש בהם כדי לברור דגים עמידים יותר ולזרז את יצירת הקווים העמידים על ידי שילוב סמנים בסלקציה המשפחתית.

בנוסף, האזורים במפה הגנטית שנמצאו במתאם עם תכונת העמידות, בפועל משתרעים על פני מרחק גנומי רב ולכן מכילים מספר גדול של גנים. בכל אחד מהאזורים הללו יתכן כי יש גן אחד או מספר גנים שמשפיעים על עמידות, אך סביר להניח כי רב הגנים באזורים אלו אינם חשובים ליצירת העמידות. כדי לצמצם את האפשרויות ולמצוא גנים המשפיעים על עמידות ולא רק אזורים בגנום, יש לצמצם את אורך האזור הנמצא במתאם. זאת ניתן לעשות על ידי שימוש בהכלאות מחזירות ואפיון מספר רב של צאצאים על ידי סמנים המפוזרים לכל אורכו של האזור. סמנים מייצגים לכל אזור יבחרו מכלל הסמנים שמצאנו במחקר זה.

זאת ועוד, הסמנים שפותחו במחקר זה ישרתו אותנו במיפוי השוואתי. כיון שבשיטת ה-GBS, הסמנים מזוהים על ידי ריצוף של מקטעים קצרים של דנ"א גנומי, נשתמש במידע הרצף כדי לזהות את האזור בגנום דג הזברה המתאים לאזורים בקרפיון שנמצאו במתאם לעמידות. בשל הקרבה

האבולוציונית, גנום דג הזברה דומה ברצף ובסידור הגנים לזה של דג הקרפיון. לדג הזברה, שהוא דג מודל, שבו קיימים ידע גנטי נרחב וכלים גנומיים מפותחים, יש בנמצא גם רצף אמין של כל הגנום וגם מיקום וזיהוי של הגנים שבתוכו. לכן, נוכל באמצעות הדמיון ברצף הסמנים לתחום אזורים בגנום דג הזברה ולבחון מהם הגנים הנמצאים בתוכו ואם הם יכולים לשמש כחשודים בהשפעה על תכונת העמידות בקרפיון.

לבסוף, שימוש במידע רצף הדנ"א שבא עם הסמנים שפיתחנו, יחד עם סידור הסמנים על המפה הגנטית שאנו מרכיבים, יסייע בהרכבה נכונה יותר של הרצף השלם של גנום הקרפיון ויצעיד אותנו קדימה לקראת מחקר גנומי מתקדם במין חשוב זה.

לסיכום, במחקר זה עשינו התקדמות משמעותית והשגנו יעדים חשובים לקידום מטרות המחקר המוצהרות. בנוסף, יצרנו כלים וידע להמשך המחקר הגנטי בקרפיון בכלל ולהמשך פיתוח והבנה של עמידות למחלות במין זה ואולי אף במיני דגים אחרים.

#### **5. רשימת הפרסומים הנובעים מן המחקר**

למחקר זה מספר חלקים אשר טיפלו בהיבטים שונים של העמידות והמחלה. החלק העוסק באפיון רמת העמידות בקבוצות שונות של BC1 הבשיל וכעת נכתב לפרסום כמאמר בעיתון מדעי. בשאר החלקים נעשתה התקדמות משמעותית אך כנושא טרם הושלמו להיקף המאפשר פרסום התוצאות. המחקר עצמו הוצג בכנס בינלאומי של גנומיקה בחקלאות מים (ראה למטה) והוגש כתקציר לשני כנסים בינלאומיים שיערכו ביוון ובארה"ב במהלך חצי השנה הקרובה.

#### **Lecture in international meeting**

Tadmor, R., Kongchum, P., Sandel, E., Lutzky, S., Hulata, G., Palti, Y. and **David, L.** Development of common carp strains genetically resistant to the Cyprinid Herpes virus-3 disease using breeding and genomics. In: GIA 2013- 3<sup>rd</sup> International Symposium of Genomics in Aquaculture. University of Nordland, Bodo, Norway, 4-6 September 2013.

## סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
במחקר זה הצענו להתקדם בפיתוח קווי קרפיון בעלי עמידות גנטית לוירוס תוך הבנה של הבסיס החיסוני הגנטי לעמידות ועל ידי שימוש במכלואים ובסיוע סמני דנ"א. מטרת המחקר היו :
1. בחינת העמידות של מכלואי BCI ואיתור משפחות עמידות למחלה.
2. איפיון השינויים בביטוי גנים של המערכת החיסונית המולדת בתגובה להדבקה בוירוס.
3. פיתוח סמני דנ"א ואיתור סמנים הנמצאים בתאחיזה לעמידות למחלה.
עיקרי התוצאות.
השונות בעמידות של כ- 40 משפחות מעידות על המרכיב הגנטי החזק והפוטנציאל לטיפוח קווי הורים עמידים.
נדגמו רקמות, הופק רנ"א והחלנו באפיון הבדלים בין דגים עמידים לרגישים בביטוי גנים תוך הדבקה בוירוס.
נעשה שימוש בעשרות אלפי סמנים ונמצאו אזורים בגנום המכילים גנים המשפיעים על עמידות למחלה.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח?
מטרות המחקר הושגו ברובן. מחקר זה קידם מאד את הידע והכלים הנדרשים לטיפוח קווים עמידים למחלה.
מחקר זה הניח בסיס לפיתוח קווי הורים לייצור צאצאים עמידים באמצעות סלקציה משפחתית.
מחקר זה הניח בסיס של סמנים שיסייעו לטיפוח של קווי הורים עמידים ולאיתור הגנים המשפיעים על עמידות.
מחקר זה הרחיב את הבנתנו על הבסיס הגנטי והחיסוני המוביל לעמידות למחלות זיהומיות בדגים.
בעיות שונות לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה ; התייחסות המשך המחקר
מדידת ההבדלים בביטוי גנים בין דגים עמידים לרגישים במהלך ההדבקה החלה אך טרם הושלמה.
יש להמשיך ולבחון את הסמנים שנמצאו כדי לבחור את אלו המתאימים לשימוש בטיפוח לעמידות.
יש לשפר את התשתית של גנום הקרפיון כדי לאפשר איתור גנים בתוך האזורים הגנומיים המשפיעים על עמידות.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח : <b>פורסומים בכתב</b> - <u>ציטט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי ;
בשלב זה לא פורסמו בכתב תוצאות ממחקר זה.
פרסום הדו"ח : אני ממליץ לפרסם את הדו"ח : (סמן אחת מהאופציות)
< <u>ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)</u>
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן – כיון שהבסיס שהונח במחקר זה מראה את ההיתכנות הגבוהה להצליח ולפתור בעיה חקלאית חשובה זו ולהרחיב את הידע על עמידות גנטית בדגים בכלל.